

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報(A) 平2-111747

⑮ Int. Cl.<sup>3</sup>C 07 C 229/22  
A 61 K 49/00  
C 07 C 227/10

識別記号

A

庁内整理番号

6516-4H  
7417-4C

⑬ 公開 平成2年(1990)4月24日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全9頁)

⑭ 発明の名称 炭素13標識5-アミノレブリン酸及びその誘導体の製造方法

⑯ 特 願 昭63-263877

⑰ 出 願 昭63(1988)10月21日

⑱ 発 明 者 梶 原 正 宏 埼玉県新座市馬場2-1-14

⑲ 出 願 人 新日鐵化学株式会社 東京都中央区銀座5丁目13番16号

⑳ 代 理 人 弁理士 成瀬 勝夫 外3名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

炭素13標識5-アミノレブリン酸及びその誘導体の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 1位及び/又は2位が炭素13で標識された酢酸ナトリウムを出発原料とし、この炭素13標識酢酸ナトリウムから誘導されるプロム酢酸エチル、メルドラム酸又はフタルグリシン化合物を中間体として5-アミノレブリン酸を合成することを特徴とする1、3、4又は5位の少くとも1つの炭素が炭素13で標識された5-アミノレブリン酸又はその誘導体の製造方法。

(2) 1位及び/又は2位が炭素13で標識された酢酸ナトリウムを出発原料とし、この炭素13標識酢酸ナトリウムから誘導されるプロム酢酸エチル、メルドラム酸又はフタルグリシン化合物を中間体として1、3、4又は5位の少くとも1つの炭素が炭素13で標識された炭素13標識5-アミノレブリン酸又はその塩を合成し、これを脱水酵素で縮合

させてポリホビリノーゲンを合成することを特徴とする少くとも2つの炭素が炭素13で標識されたポリホビリノーゲンの製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は、炭素13で標識された5-アミノレブリン酸及びその誘導体の製造方法及びこれを原料とするヘム前駆体ポリホビリノーゲンの製造方法に関する。これらの化合物は、生合成や代謝の研究あるいは診断のために有用である。

〔従来の技術〕

高磁場FT-NMRの進歩により、炭素13で標識された化合物が有機化学や生化学における種々の問題の解決のために広く適用されるようになってきた。これは、高磁場FT-NMRを使用することにより、生合成経路等の研究において極めて重要な炭素13(<sup>13</sup>C)で標識された化合物の<sup>13</sup>C標識位置をこの<sup>13</sup>C標識化合物を分解することなく決定することができるからである。また、このような<sup>13</sup>C標識化合物のいくつかは既に市販され

てはいるが、非常に高価であるばかりでなく、その種類も限られている。

ところで、5-アミノレブリン酸(ALA)は、ヘム前駆体ポルホピリノーゲン(PBG)を経由してヘムやクロフィルあるいはビタミンB<sub>12</sub>を合成する際の中間体となり、また、除草剤としても有用であることが報告されている。そして、このALAについては、その5位の炭素が<sup>13</sup>Cで標識された化合物([5-<sup>13</sup>C]-ALA)が市販品として入手できるが、これは[2-<sup>13</sup>C]マロン酸エチルエステルあるいはエチル-4-オキソブチレートから合成されており、この方法が実験室的規模にのみ適した合成法であることから極めて高価である。

そこで、本発明者らは、[2-<sup>13</sup>C]酢酸ナトリウムからブロム酢酸エチルを経由して[2-<sup>13</sup>C]ALAを合成する方法を完成し報告した(J. A. C. S., 96:26, p8069-8080(Dec. 25, 1974)。この方法は、出発物質として<sup>13</sup>Cで標識された酢酸ナトリウムを使用するのであり、この<sup>13</sup>C標識酢酸ナトリウムが固体であることからその取扱が容易であ

って、大量に使用されているために比較的安価であるという利点がある。

しかしながら、この<sup>13</sup>C標識酢酸ナトリウムを出発物質として<sup>13</sup>Cで標識されたALAを合成する方法については、この[2-<sup>13</sup>C]ALAを合成する方法以外には報告されていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

そこで、本発明者は、<sup>13</sup>C標識酢酸ナトリウムを出発原料としてALAの任意の位置が<sup>13</sup>Cで標識された<sup>13</sup>C標識ALAを合成することができれば、生化学の研究の発展に役立つところが大きいという観点から鋭意研究を重ねた結果、1位及び/又は2位が<sup>13</sup>Cで標識された酢酸ナトリウムを使用して目的を達成し得ることを見出し、本発明に到達した。

従って、本発明の目的は、1位及び/又は2位が<sup>13</sup>Cで標識された酢酸ナトリウムを出発原料として、任意の位置が<sup>13</sup>Cで標識されたALAを製造する方法を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

すなわち、本発明は、1位及び/又は2位が炭素13で標識された酢酸ナトリウムを出発原料とし、この炭素13標識酢酸ナトリウムから誘導されるブロム酢酸エチル、メルドラム酸又はフタルグリシン化合物を中間体として5-アミノレブリン酸を合成する1、3、4又は5位の少くとも1つの炭素が炭素13で標識された5-アミノレブリン酸又はその誘導体の製造方法である。また、本発明は、このようにして合成された1、3、4又は5位の少くとも1つの炭素が炭素13で標識された5-アミノレブリン酸を使用し、これを脱水酵素で縮合させてポルホピリノーゲンを合成する少くとも2つの炭素が炭素13で標識されたポルホピリノーゲンの製造方法である。

以下、本発明の製造方法を第1図及び第2図に示す製造工程に基いて詳細に説明する。

第1図は<sup>13</sup>C標識ALAの製造方法を示すもので、例えば[1-<sup>13</sup>C]ALA(1a)は次のようにして合成される。

すなわち、[1-<sup>13</sup>C]酢酸ナトリウム(2a)を臭素

と臭化ベンゾイルで処理し、これに無水エタノールを加えて反応させると[1-<sup>13</sup>C]ブロム酢酸エチル(3a)が得られる。また、この[1-<sup>13</sup>C]ブロム酢酸エチル(3a)は[1-<sup>13</sup>C]酢酸ナトリウム(2a)を酸分解して得られる[1-<sup>13</sup>C]酢酸からも高収率で得ることができる。

この[1-<sup>13</sup>C]ブロム酢酸エチル(3a)は、1,2-ジメトキシエタン中で水酸化ナトリウムを使用し、室温で数日間エチルフルイミドアセトアセート(11)と反応させると、高収率で[1-<sup>13</sup>C]エチル-3-エトキシカルボニル-5-フルイミドレプリエート(12a)を与える。

このジエステル(12a)は、氷酢酸と濃塩酸の1:1混合物で半日程度処理することにより、目的の[1-<sup>13</sup>C]ALA(1a)を高収率で与える。

また、上記と同様にして[2-<sup>13</sup>C]酢酸ナトリウム(2b)から[2-<sup>13</sup>C]ブロム酢酸エチル(3b)を合成し、上記の[1-<sup>13</sup>C]ブロム酢酸エチル(3a)をこの[2-<sup>13</sup>C]ブロム酢酸エチル(3b)に置換えて上記と同様の反応を行うことにより、[2-<sup>13</sup>C]ALA

(1b)を高収率で合成することができる。

さらに、 $[4-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1d)と $[5-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1e)の合成は以下の方法で行うことができる。

すなわち、無水フタル酸(8)と上記 $[1-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸エチル(3a)から合成される $[1-^{13}\text{C}]$ グリシン(9a)とを $165^\circ\text{C}$ で15分間程度の条件で反応させることにより $[1-^{13}\text{C}]$ N-フタロイルグリシン(6a)を合成する。なお、この $[1-^{13}\text{C}]$ N-フタロイルグリシン(6a)は、フタルイミドカリウム(4)と $[1-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸エチル(3a)との反応によっても合成される。さらに、このようにして合成された $[1-^{13}\text{C}]$ N-フタロイルグリシン(6a)を塩化チオニルで処理すれば、容易に $[1-^{13}\text{C}]$ フタルイミドアセチルクロライド(7a)が得られる。

そして、この $[1-^{13}\text{C}]$ フタルイミドアセチルクロライド(7a)をジクロロメタンとピリジンの混合溶液中で2,2-ジメチル-4,6-ジオキソ-1,3-ジオン(メルドラム酸、10)と反応させ、乾燥エタノールで処理することにより、高収率で $\beta$ -ケトエステル(11b)が得られる。なお、上記メルドラム

酸(10)は、公知の方法により、酢酸ナトリウム(2)からプロモ酢酸(13)を経る合成経路により容易に合成される。

さらに、この $\beta$ -ケトエステル(11b)をプロモ酢酸エチル(3)と水系化ナトリウムで処理した後、酸で加水分解することにより、目的の $[4-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1d)が得られる。

同様に、 $[5-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1e)も $[2-^{13}\text{C}]$ フタルイミドアセチルクロライド(7b)を経由する合成経路で上記と同様に合成される。

$[3-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1c)も $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム(2b)から $[2-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸(13a)を経て合成される $[2-^{13}\text{C}]$ メルドラム酸(10a)を経由する合成経路で上記と同様に合成される。

以上、いずれか1つの炭素が $^{13}\text{C}$ で標識されたALAの製造方法を説明したが、2つ以上の炭素が $^{13}\text{C}$ で標識されたALAも上記と同様な方法で製造することができる。例えば、 $[1,2-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1f)は $[1,2-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム(2c)から $[1,2-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸エチル(3c)を経て化合物

$[1,2-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸エチル(3c)を経て化合物

(12)を経由して合成される。

また、 $[4,5-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1g)は上記 $[1,2-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム(2c)から $[1,2-^{13}\text{C}]$ プロモ酢酸エチル(3c)あるいは $[1,2-^{13}\text{C}]$ グリシン(9c)を合成し、化合物(7)、(11)及び(12)を経由して合成される。

さらに、 $[3,4,5-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1h)は、上記 $[1,2-^{13}\text{C}]$ フタルイミドアセチルクロライド(7)と $[2-^{13}\text{C}]$ メルドラム酸(10a)から化合物(11)及び(12)を経由して合成される。

また、 $^{13}\text{C}$ で標識されたALAの誘導体としては種々のものがあるが、代表的には塩酸塩、ナトリウム塩等の塩、メチルエステル等のエステル、酸塩化物等の酸ハライド、アミド等が挙げられ、これらは公知の方法により容易に製造することができる。

次に、第2図は、ALAからポリホピリノゲン(PBG)を製造する製造工程を示すもので、第1図に示す方法で得られた1つの炭素が $^{13}\text{C}$ で標識されたALAを使用し、2つの炭素が $^{13}\text{C}$ で標識

された $^{13}\text{C}$ 標識PBGの合成例を示すものである。

例えば、第2図に示すように、 $[5-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1e)をALA脱水酵素(ALA-D又はPBG synthase)で縮合させると、ピロール環の2位の炭素とアミノ基に隣接する炭素の2つが $^{13}\text{C}$ で標識されたPBG(20c)が得られる。

また、第2図に示すように、上記 $[5-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1e)に代えて $[3-^{13}\text{C}] \text{ALA}$  (1c)を使用すると、ピロール環の4位の炭素とピロール環の3位に結合する炭素の2つが $^{13}\text{C}$ で標識されたPBG(20c)が得られる。

同様に、他の位置の炭素が $^{13}\text{C}$ で標識されたALA(1a)、(1b)又は(1d)を使用することにより、それぞれ対応する部位の炭素が $^{13}\text{C}$ で標識されたPBGが得られる。また、2つの炭素が $^{13}\text{C}$ で標識されたALAを使用すれば、4つの炭素が $^{13}\text{C}$ で標識されたPBGが得られ、さらに、3つの炭素が $^{13}\text{C}$ で標識されたALAを使用すれば、6つの炭素が $^{13}\text{C}$ で標識されたPBGが得られる。

特開平2-111747(4)

このようにして製造されたPBGは、例えば鉛中毒の診断薬等として有用である。

【実施例】

以下、実施例及び参考例に基いて、本発明方法を具体的に説明する。

実施例1

1,2-ジメトキシエタン7ml中にエチルフルイミドアセトアセテート(11)8.47g(3.31mmol)を溶解し、この溶液を1,2-ジメトキシエタン7mlと水系化ナトリウム(パラフィン中60%)15.40g(3.85mmol)の懸濁液中に添加し、アルゴン雰囲気下に室温で1時間攪拌した。その後、この懸濁液中に乾燥1,2-ジメトキシエタン5ml中に[1-<sup>13</sup>C]アロモ酢酸エチル(3a)6.47g(3.85mmol)を溶解して得られた溶液を加え、室温で1日間攪拌し、得られた反応混合物を1N-塩酸で中和し、エーテルで抽出した。得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、乾燥剤で乾燥し、溶媒を留去して無色針状結晶の[1-<sup>13</sup>C]エチル-3-エトキシカルボニル-5-フタルイミドレプリネート(1

ノレプリン酸ハイドロクロライド(1a)1.25g(収率71%)を得た。

このものの融点、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR及びIRを測定した結果を以下に示す。

融点: 146~149℃

<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O): 2.71, 2.90, 4.13 ppm

<sup>13</sup>C-NMR(D<sub>2</sub>O): 177.4 (1-<sup>13</sup>C) ppm

IR(KBr): 3430 cm<sup>-1</sup>

実施例2

[1-<sup>13</sup>C]グリシン(9a)(99% atom <sup>13</sup>C)1.0g(13.1mmol)と無水フタル酸1.95g(13.1mmol)の混合物をそれが融解しそして再び固化するまで150~170℃で10分間加熱し、得られた生成物を水で再結晶し、乾燥して無色針状結晶の[1-<sup>13</sup>C]フタルイミド酢酸(6a)2.64g(収率97.5%)を得た。

このものの融点、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、IR及びMSを測定した結果を以下に示す。

融点: 191~194℃

2a) 1.25g(収率89.7%)を得た。

このものの融点、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、IR及びMSを測定した結果を以下に示す。

融点: 71~74℃

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.25 & 1.33, 2.95, 4.18 & 4.29, 4.19, 4.83, 7.83 ppm

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 170.6 (1-<sup>13</sup>C) ppm

IR(KBr): 1723 cm<sup>-1</sup>

HS(m/z): 362(H<sup>+</sup>)

次に、このようにして得られたジエステル(12a)を氷酢酸-濃塩酸(1:1)混合液15ml中に溶解し、アルゴン雰囲気中で1日間加熱還流した。反応終了後、反応混合物中の溶媒を留去し、得られた茶色の残渣粉末を水20ml中に溶解し、過剰の塩化水素を留去した。得られた残渣物を再び水40ml中に溶解し、フタル酸を除去するために酢酸エチル150mlで3回洗浄した。このようにして得られた水相を濃縮し、残渣物をイオン交換樹脂で精製し、凍結乾燥し、さらにエタノール/エーテル溶媒で再結晶し、無色針状結晶の[1-<sup>13</sup>C]5-アミ

<sup>1</sup>H-NMR(アセトン-d<sub>6</sub>): 4.40, 7.82 ppm

<sup>13</sup>C-NMR(アセトン-d<sub>6</sub>): 168.93 (1-<sup>13</sup>C) ppm

IR(KBr): 1720, 1775 cm<sup>-1</sup>

HS(m/z): 206(H<sup>+</sup>)

このようにして得られた[1-<sup>13</sup>C]フタルイミド酢酸(6a)2.64g(12.8mmol)を塩化チオニル12ml(61.8mmol)中に溶解し、60℃で4時間加熱還流し、その後過剰の塩化チオニルを除去した。得られた淡黄色固体をベンゼン中に溶解し、このベンゼンを留去することによって塩化チオニルを完全に除去し、淡黄色結晶の[1-<sup>13</sup>C]フタルイミドアセチルクロライド(7a)2.91g(収率99.2%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)測定結果は4.80, 7.78 ppmであった。

次に、ジクロロメタン1mlとピリジン2mlの混合溶媒中にメルドラム酸(20)1.95g(13.5mmol)を溶解し、この溶液中に0℃でアルゴン雰囲気下に1.5時間かけて上記[1-<sup>13</sup>C]フタルイミドアセチルクロライド(7a)2.91g(13.0mmol)

特開平2-111747(5)

1)のジクロロメタン2ml溶液を滴下し、さらに攪拌下に室温で1.5時間反応させた。反応終了後、得られた反応生成物を6N-塩酸と飽和食塩水で洗浄し、乾燥剤で乾燥し、溶媒を留去した。得られた粘性オイルを無水エタノール100ml中で3時間還流し、その後過剰のエタノールを留去した。残渣物をジクロロメタン100mlで希釈し、飽和重曹水と飽和食塩水で洗浄し、乾燥剤で乾燥した後溶媒を留去し、得られた粗生成物をエタノールで再結晶し、無色針状結晶の[3-<sup>13</sup>C]エチルフタルイミドアセトアセテート(11b)2.33g(収率65.4%)を得た。

このものの融点、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、IR及びMSを測定した結果を以下に示す。

融点: 109~111℃

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.29, 3.30, 4.22, 4.62, 7.77

ppm

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 194.79 (3-<sup>13</sup>C) ppm

IR(KBr): 1722, 1745 cm<sup>-1</sup>

MS(m/z): 276(M<sup>+</sup>)

合溶液20ml中に溶解し、アルゴン雰囲気中120℃で一晩加熱還流した。反応終了後、反応混合物中の溶媒を留去し、得られた茶色の残渣を水50ml中に溶解し、フタル酸を除去するために酢酸エチル150mlで3回洗浄した。このようにして得られた水層を濃縮し、残渣物をイオン交換樹脂で精製し、凍結乾燥し、さらにエタノール/エーテル溶媒で再結晶し、無色針状結晶の[4-<sup>13</sup>C]5-アミノレブリン酸ハイドロクロライド(1d)391.0mg(収率27.5%)を得た。

このものの融点、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR及びIRを測定した結果を以下に示す。

融点: 146~149℃

<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O): 2.71, 2.90, 4.13 ppm

<sup>13</sup>C-NMR(D<sub>2</sub>O): 206.3 (1-<sup>13</sup>C) ppm

IR(KBr): 3430 cm<sup>-1</sup>

### 実施例3

[2-<sup>13</sup>C]プロモ酢酸(2b)1.473g(10.6mmol)の水溶液1.5mlに炭酸ナトリウム0.58g(5.4mmol)を加えた後、シアン化ナトリウム

このようにして得られた上記[3-<sup>13</sup>C]エチルフタルイミドアセトアセテート(11b)2.33g(8.43mmol)を1,2-ジメトキシエタン20ml中に溶解し、得られた溶液を水系化ナトリウム(パラフィン中60%)420.0mg(10.5mmol)の1,2-ジメトキシメタン5ml懸濁液中に攪拌下0℃で添加し、その後アルゴン雰囲気下に室温で1時間攪拌した。さらに、得られたこの懸濁液中にプロム酢酸エチル(3)1.76g(10.5mmol)の1,2-ジメトキシエタン5ml溶液を添加し、室温で攪拌下に2日間反応させた。反応終了後、得られた反応混合物を1N-塩酸で中和し、エーテルで抽出し、オレンジ色のエーテル層を飽和食塩水で洗浄し、乾燥剤で乾燥して溶媒を留去し、粗生成物の[4-<sup>13</sup>C]エチル-3-エトキシカルボニル-5-フタルイミドレプリネート(12d)を得た。この粗生成物(12d)は精製することなくそのまま次の反応に使用した。

上記粗生成物(12d)を氷酢酸-濃塩酸(1:1)混

0.60g(12.3mmol)の水溶液1.5mlを氷冷下に滴下し、湯浴中で40分間反応させた。その後、一旦室温に戻した後、水酸化ナトリウム0.5gを加え、湯浴中で2時間加熱した。さらに、この溶液に塩化カルシウム0.8gの水溶液を加えた後、室温で2日間反応させた。反応終了後、生成物を濃縮し、水洗、乾燥した後、エーテルを加え、さらに12N-塩酸1.0mlを加えた後、エーテル抽出をした。得られたエーテル層を乾燥後、溶媒を留去し、粗生成物の[2-<sup>13</sup>C]マロン酸0.444g(収率40.3%)を得た。

次に、上記[2-<sup>13</sup>C]マロン酸を無水酢酸0.5mlと濃硫酸0.05mlの混合液中に懸濁させ、氷冷下に無水アセトン0.4mlを滴下し、室温で1時間反応させた。反応終了後、析出した結晶を濃縮し、得られた粗結晶を0.5N-硫酸2mlで洗浄し、水洗してアセトン/エーテル/n-ヘキサン(1:1)の混合溶媒で再結晶し、無色針状結晶の[2-<sup>13</sup>C]メルドラム酸(10a)0.311g(収率50.6%)を得た。

このものの融点、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR

特開平2-111747(6)

及びIRを測定した結果を以下に示す。

融点：92～95℃

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 3.62, 1.79 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 36.15 ( $2\text{-}^{13}\text{C}$ ) ppm

IR: 1790, 1750 $\text{cm}^{-1}$

次に、上記  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ メルドラム酸(10a)を使用し、上記  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ ALA・HCl(1a)と同様にして  $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ ALA・HClを合成した。

中間生成物及び  $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ ALA・HClについて融点、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、IR及びMSを測定した。結果を以下に示す。

$[2\text{-}^{13}\text{C}]$ エチルフタルイミドアセトアセテート(11a)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 1.31, 3.58, 4.24, 4.76, 7.88

& 7.75 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 46.90 ( $2\text{-}^{13}\text{C}$ ) ppm

$[3\text{-}^{13}\text{C}]$ エチル-3-エトキシカルボニル-5-フタルイミドレプリネート(12c)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 1.26, 1.35, 2.94, 3.02, 4.15, 4.16, 4.28, 4.73, 4.94, 7.88

丸底フラスコ中に安息香酸1.1g(9.0mmol)と  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム(2b)8.20g(10mmol)とを仕込み、さらに臭化ベンゾイル7.5ml(64mmol)を加え、120℃で5時間加熱下に反応させた。生成したアセチルプロマイドを受器に蒸留し、この受器中に-78℃で5分間乾燥臭素2.6ml(50mmol)を導入した。この臭素導入終了後、反応混合物を室温で数分間攪拌し、さらに5時間還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、過剰の臭素を窒素ガスブローによって除去し、次いで-78℃で10分間かけて乾燥エタノール2.4ml(40mmol)を加え、室温で12時間攪拌下に反応させた。反応生成物を飽和重曹水10mlで中和し、エーテル30mlで3回抽出し、得られたエーテル層(90ml)を10mlの水で2回洗浄し、乾燥剤で乾燥し、エーテルを留去して淡黄色オイル状の  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ アロム酢酸エチル(3b)9.91g(収率59.3%)を得た。

このものの  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及びIRを測定した。結果を以下に示す。

& 7.74 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 52.05 ( $3\text{-}^{13}\text{C}$ ) ppm

$[3\text{-}^{13}\text{C}]$ ALA・HCl(1c)(収量1.285

g、化合物(10a)からの収率27.3%)

融点：147℃

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ : 2.70, 2.89, 2.89, 4.12 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ : 36.8 ( $3\text{-}^{13}\text{C}$ ) ppm

IR(KBr): 3430 $\text{cm}^{-1}$

実施例4

$[2\text{-}^{13}\text{C}]$ グリシンを使用した以外は実施例2と同様にして  $[5\text{-}^{13}\text{C}]$ ALA・HClを得た。このものの  $^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ は47.8ppmであった。

なお、 $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ アロム酢酸エチル(3b)を使用した以外は実施例1と同様にして  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ ALA・HCl(1b)を得た。このものの融点は148℃、 $^{13}\text{C-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ は31.6ppm、IR(KBr)は3430 $\text{cm}^{-1}$ であった。

参考例1： $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ アロム酢酸エチル(3b)の合成

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 1.35, 3.15, 4.20 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 25.9 ( $2\text{-}^{13}\text{C}$ ) ppm

IR(KBr): 1735 $\text{cm}^{-1}$

参考例2： $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ アロム酢酸エチル(3a)の合成

$[1\text{-}^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム(2a)を使用し、上記参考例1と同様にして調製した。得られた  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ アロム酢酸エチル(3a)の  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及びIRを測定した。結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 1.35, 3.77, 4.20 ppm

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 167.2 ( $1\text{-}^{13}\text{C}$ ) ppm

IR: 1735 $\text{cm}^{-1}$

参考例3： $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ エチルフタルイミドアセテート(5b)の合成

ジメチルホルムアミド7.6ml中で  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ アロム酢酸エチル(3b)9.39g(5.59mmol)とフタルイミドカリウム(4)1.15g(6.22mmol)とを3時間還流下に反応させ、得られた反応混合物を15mlのクロロホルムで4回抽出し、クロロホ

ルム瓶(60ml)を0.1N-水酸化ナトリウム溶液10mlで中和し、15mlの水で2回洗浄し、乾燥剤で乾燥し、溶媒を留去して得られた粗生成物をエタノールで再結晶し、無色針状結晶の[2-<sup>13</sup>C]エチルフタルイミドアセテート(5b)975mg(収率75.0%)を得た。得られた[2-<sup>13</sup>C]エチルフタルイミドアセテート(5b)の<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、IR及びMSを測定した。結果を以下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.25, 3.72, 4.29, 7.78 ppm  
<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 38.98 (2-<sup>13</sup>C) ppm  
 IR(KBr): 1776, 1732, 1720 cm<sup>-1</sup>  
 MS(m/z): 234(M<sup>+</sup>)

#### 参考例4: [2-<sup>13</sup>C]グリシン(9b)の合成

上記参考例3で得られた[2-<sup>13</sup>C]エチルフタルイミドアセテート(5b)250mg(1.07 mmol)を6N-塩酸6.25ml中に溶解し、5時間還流下に反応させた。反応混合物を同量の水で希釈し、10mlの酢酸エチルで3回洗浄し、水層を留去して得られた残渣物をイオン交換樹脂で精製し、白色粉末状の[2-<sup>13</sup>C]グリシン(9b)108mg(収率90

.0%)を得た。得られた[2-<sup>13</sup>C]グリシン(9b)の<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、IR及びMSを測定した。結果を以下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O): 3.70 ppm  
<sup>13</sup>C-NMR(D<sub>2</sub>O): 49.93 (s, <sup>13</sup>C) ppm  
 IR(KBr): 3100, 1600 cm<sup>-1</sup>  
 MS(m/z): 76(M<sup>+</sup>)

#### 実施例5

5mm NMRチューブの中に内部標準としてジオキサンを含有する重水中に<sup>13</sup>C標識ALAを溶解した溶液0.1mlを仕込み、この<sup>13</sup>C標識ALA溶液中に0.5M-磷酸ナトリウム緩衝液0.05mlと同量の硫酸亜鉛(1mM)-ジチオトレイトール(100mM)とを添加し、さらに5-アミノレブリン酸脱水酵素0.3mlを加えて急速に攪拌し、この混合物を培養して酵素反応を行った。

ここで使用した5-アミノレブリン酸脱水酵素は、ヒト末梢血液(human peripheral blood)から単離されたもので、生成酵素はGranick Hauzerall法

で分析したところ12.6 units/mgの比活性を有するものであった。

この酵素反応においては、JEOL-GX-400 スペクトロメーターを使用し、100.4 MHzで5mm NMRチューブ内の磷酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8)におけるプロトンデカップリング<sup>13</sup>C-NMRスペクトルが測定された。これらのスペクトルは、パルス幅5.5 μs(45°パルス)とスペクトル幅25000 Hzを使用して20℃で測定された。重水の内部ロックが用いられ、そしてケミカルシフトはジオキサン(67.4 ppm)を内部基準として測定した。

<sup>13</sup>C標識ALAとして[5-<sup>13</sup>C]ALA(1e)を使用したとき、ピロール環の2位の炭素とアミノ基に隣接する炭素の2つが<sup>13</sup>Cで標識されたPBG(20e)が生成する。これは、第2図(a)、(b)に示すように、[5-<sup>13</sup>C]ALAのシグナル(δ=47.8 ppm)が経時的に減少し、それにつれてPBGに帰属する2つのシグナル(δ=35.5 ppm及びδ=117.2 ppm)が増加していくことで確認された。

また、[3-<sup>13</sup>C]ALA(1c)を使用したとき、ピロール環の3位の炭素とピロール環の4位に結合する炭素の2つが<sup>13</sup>Cで標識されたPBG(20c)が生成していることが上記と同様に第3図(a)、(b)のシグナルの経時的変化によって確認された。

#### [発明の効果]

本発明によれば、1位及び/又は2位が<sup>13</sup>Cで標識された酢酸ナトリウムを出発原料として、5-アミノレブリン酸の少くとも1つの任意の位置が<sup>13</sup>Cで標識された5-アミノレブリン酸及びその誘導体を製造することができ、また、この<sup>13</sup>C標識5-アミノレブリン酸を使用して少くとも2つの炭素が<sup>13</sup>Cで標識された種々のポリヒドロキノン-ゲンを製造することができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は1位及び/又は2位が<sup>13</sup>Cで標識された酢酸ナトリウムから任意の位置が<sup>13</sup>Cで標識された5-アミノレブリン酸を合成する合成経路を示すチャート、第2図(a)、(b)は[5-<sup>13</sup>C]5-アミ

ノレアリン酸から  $^{13}\text{C}$  標識ボルホピリノーゲンを合成する合成経路を示すチャートとその時の経時変化を示す  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル、第3図(a)、(b)は [3- $^{13}\text{C}$ ]5-アミノレアラニン酸から  $^{13}\text{C}$  標識ボルホピリノーゲンを合成する合成経路を示すチャートとその時の経時変化を示す  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。

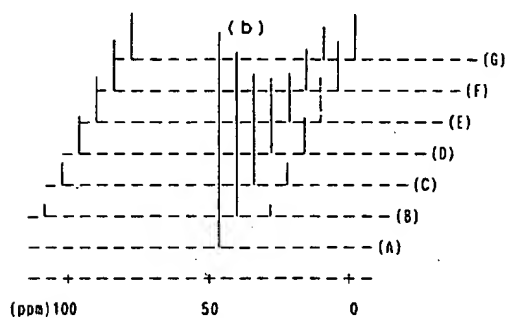
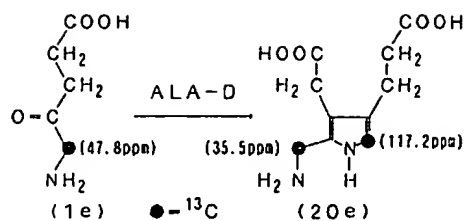
特許出願人 新日鐵化学株式会社  
代 理 人 弁理士 成 瀬 勝 夫  
(外3名)





第 2 図

(a)



第 3 図

(a)

